

Comparación entre las pruebas de aglutinación con sangre completa en placa, suero en tubo y placa y su uso para la erradicación de la pulorosis en 3 granjas reproductoras

HANS DIKKEN, M.V., Drs.¹

(Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1966)

Actualmente la industria reproductora avícola de México, se compara a la de otros países, cuya tecnología es avanzada; no obstante no se ha elaborado un plan sanitario con la finalidad de controlar la pulorosis.

Para demostrar que en México es posible controlar esa enfermedad, se realizó un experimento piloto para la erradicación de *Salmonella pullorum* en tres granjas reproductoras, en una de ellas existía un brote de pulorosis.

Materiales y métodos

Para el presente experimento se utilizaron 2,800 gallinas reproductoras de tres granjas, dos de ellas (A y B) en el Distrito Federal y una (C) en el estado de México, en esta última granja las aves se encontraban enfermas de pulorosis. En las tres granjas se indicaron las medidas higiénicas necesarias para prevenir la presentación de enfermedades. Se sangraron las aves de más de 5 meses de edad o las que tenían más del 50% de postura, el sangrado se efectuó de la vena yugular. Las pruebas de aglutinación en placa con sangre completa se efectuaron en la misma granja, dejándose coagular 4 ml de sangre para pruebas posteriores de suero en placa y en tubo, en el laboratorio.

En las granjas cada 3 ó 4 semanas se efectuaron series de reacciones a todas las aves mayores de 5 meses de edad (The National

Poultry and Turkey Improvement Plans, 1961; Roepke, 1961) o a las que tenían 50% o más de postura (Smith, 1954). Las pruebas se hicieron hasta que los resultados fueron negativos a dos pruebas consecutivas para en ese momento poder declarar la granja libre de pulorosis (Hagen and Bruner, 1951).

El antígeno polivalente contra la *Salmonella pullorum* que se utilizó para las reacciones de aglutinación, fue preparado de acuerdo con la técnica de Cordón (1953), se igualó el estándar de los antígenos usados por Estados Unidos de Norteamérica, Holanda, Inglaterra y otros países en los que ya se ha controlado la enfermedad.

Se prepararon dos antígenos madre, uno a partir de la cepa estándar² y otro a partir de la cepa variante;² a los dos se les efectuaron pruebas de pureza y sensibilidad; la de pureza se hizo por medio de frotis teñidos de Gram y la de sensibilidad (Cordón, 1963) al aglutinar con diferentes diluciones de antisuero "O" *Salmonella* monofactor 9³ con título no menor de 1:250.

A cada lote de antígeno madre se le tituló diluyéndolo, hasta obtener una concentración de gérmenes igual a la densidad del tubo 1 del nefelómetro de McFarland o al tubo 1 de la escala de Brown. Sólo se aceptaron los antígenos preparados con la cepa estándar que tuvieron títulos de \pm 1:360 o mayores (Cordón, 1963). Los antígenos elaborados a par-

1 Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación, adscrito al Departamento de Patología Animal, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15½, Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

2 Proporcionado por la Houghton Poultry Research Station, England.

3 Proporcionado por el Public Health Laboratory Service, London, England.

tir de cepas variantes debían tener títulos de $\pm 1:180$.

El antígeno usado en las pruebas de aglutinación en tubo (Cordón, 1953) se hizo con partes iguales de antígeno madre estándar y antígeno madre variante, diluidos previamente hasta alcanzar la concentración del tubo 1 del nefelómetro de McFarland, una vez mezclados se les agregó formaldehído a una concentración final de 0.25% y un pH de 7.0 a 7.2. El antígeno utilizado en las pruebas de aglutinación con suero en placa difería del anterior, únicamente por tener una dilución 50 veces mayor a la del tubo 0.75 del nefelómetro de McFarland. El antígeno usado para las pruebas de aglutinación con sangre completa en placa, era igual al anterior con excepción de contener 1% de cristal violeta, al 3% (Cordón, 1953).

Para las pruebas de aglutinación en placa con sangre completa se utilizaron 0.02 ml de sangre mezclados a la temperatura ambiente, con 0.04 ml del antígeno coloreado (Cordón, 1942). Las lecturas se hicieron máximo dos minutos después de realizada la mezcla, identificándose cada reacción de acuerdo al número de anillos del ave; esta prueba se realizó en las granjas.

Las reacciones con suero, en placa y tubo, se llevaron a cabo en el laboratorio. Las de suero en placa se hicieron en forma similar a la reacción de aglutinación con sangre completa, pero se utilizó antígeno sin colorear (The National Poultry and Turkey Improvement Plans, 1961). Para las reacciones de aglutinación en tubo con suero, se hicieron dos diluciones (Cordón, 1963); la primera con 20 partes de antígeno por unidad de suero 1:20 (0.05 ml de suero y 1 ml de antígeno) y la segunda con 50 partes de antígeno por unidad de suero 1:50 (0.02 ml de suero y 1 ml de antígeno). Los tubos de esta prueba se identificaron con el número del anillo del ave y se incubaron a 37°C por ± 20 horas (Cordón, 1953) después de las cuales se efectuó la lectura.

De acuerdo con los resultados de las pruebas se separaron las aves y se eliminaron aquellas cuyas reacciones fueron francamente positivas. Las aves con reacciones dudosas se confinaron en gallineros separados y tres o cuatro semanas después se les volvieron a efectuar las

mismas pruebas, dividiendo las aves en reactivas positivas y negativas, desechando las primeras.

Se efectuó un registro con los resultados de las tres reacciones de aglutinación, para poder utilizarlos en dos diferentes métodos de análisis.

1° El que permitiera evaluar cuantas veces se efectuaron las tres distintas pruebas a todas las aves, hasta poder declarar erradicada la pulorosis de las granjas. Para esta forma de análisis se asumió el criterio de considerar los resultados de las tres diferentes reacciones de aglutinación de cada muestra, como uno solo.

2° Se agruparon y compararon los tres diferentes métodos de aglutinación para decidir cuál de ellos dio los resultados más satisfactorios.

Resultados y discusión

Primer análisis:

En el Cuadro 1, se pueden ver los resultados de las pruebas efectuadas en las tres granjas. En el Cuadro 2 se mencionan los resultados y los porcentajes en forma extractada, del total de aves positivas y negativas de cada granja. Ambos cuadros permiten saber cuántas veces se efectuaron las tres diferentes reacciones en cada granja hasta erradicar la enfermedad.

En el Cuadro 1, se ve que en las Granjas A y B no se encontraron animales con reacciones positivas al efectuar la tercera y cuarta serie de reacciones; por lo que se decidió, de acuerdo con el criterio establecido previamente, que la enfermedad había sido erradicada en ambas granjas.

En la granja C, donde se había presentado un brote de pulorosis, se hicieron cinco series de reacciones, ya que sólo así fue posible tener dos series negativas, consecutivas y declarar erradicada la enfermedad. Lo cual se logró con una prueba más en comparación con las cuatro series efectuadas en las granjas A y B.

De las 450 aves, a las que se les hicieron reacciones de aglutinación, en la Granja A, 17 resultaron francamente positivas y 17 dudosas. De estas últimas, 3 resultaron positivas a la siguiente serie de reacciones, de las 14 restantes todas fueron negativas a reacciones

Cuadro 1. Resultado de las pruebas de aglutinación de S. pullorum a 2,800 aves en 3 granjas hasta haberlas declarado libres de pulorosis.

	No. de muestras	Positi vas	Negati vas	Dudo- sas	Primera repe- tición a las reacciones dudosas		Segunda repeti- ción a las reac- ciones que pre- viamente fue- ron dudosas
GRANJA A							
1ª. reacción	450	17	419	14 ↘	Posit.	Neg.	
Segunda	433	0	416	3 ↘	3	11 ↘	
Tercera	430	0	416	0 ↘	0	3 ↘	11
Cuarta	430	0	416	0 ↘	0	0 ↘	11 y 3
Total	1,743	17	1,667	17 ↘	3	14	25
GRANJA B							
1ª. reacción	1,403	39	1,346	18 ↘			
Segunda	1,364	0	1,344	2 ↘	3	15 ↘	
Tercera	1,361	0	1,344	0 ↘	0	0 ↘	15
Cuarta	1,361	0	1,344	0 ↘	0	0 ↘	15 y 2
Total	5,489	39	5,378	20	3	17	32
GRANJA C							
1ª. reacción	947	97	830	20 ↘			
Segunda	850	12	802	16 ↘	18	2 ↘	
Tercera	820	2	797	3 ↘	15	1 ↘	2
Cuarta	803	0	797	0 ↘	1	2 ↘	2 y 1
Quinta	802	0	797	0 ↘	0	0 ↘	2, 1, y 2
Total	4,222	111	4,023	39	34	5	10

consecutivas arrojando un total de 20 aves positivas (4.4%).

De las 1,403 aves, a las que se les hicieron reacciones en la granja B, resultaron franca- mente positivas 39 y 20 dudosas. De esas 20 dudosas 3 fueron positivas y las 17 restantes

negativas en reacciones consecutivas. Termi- nando con un total de 42 positivas (3.0%).

En la granja C, los resultados fueron dife- rentes a las otras dos granjas. De 947 reac- ciones iniciales, 111 fueron francamente po- sitivas y 39 dudosas. De estas últimas 34

Cuadro 2. Resumen de los resultados de las pruebas de aglutinación de S. pullorum a 2,800 aves de 3 granjas.

Granjas	Total de Aves	Positi vas		Negati vas	
		No.	%	No.	%
A	450	20	4.4	430	95.6
B	1,403	42	3	1,361	97
C	947	145	15.3	802	84.7

Cuadro 3. Combinaciones de los resultados de 11,454 pruebas de aglutinación de *S. pullorum* por 3 diferentes métodos.

Diferentes combinaciones de las reacciones de 3 métodos de aglutinación	Muestras por combinaciones No.	Reacciones		
		SaC ^a	SuP ^b	SuT ^c
I	201	+	+	+
II	12	d ^d	d	d
III	3	+	+	--
IV	3	+	--	--
V	10	d	--	d
VI	54	--	d	d
VII	58	d	--	--
VIII	8	--	d	--
IX	17	--	--	d
X	11,088	--	--	--

a Aglutinación de sangre completa en placa.

b Aglutinación de suero en placa.

c Aglutinación de suero en tubo.

d Reacción dudosa.

+ Reacción positiva.

- Reacción negativa.

resultaron positivas a la siguiente prueba y negativas 5, a pruebas consecutivas. Dando un total de 145 positivas (15.3%).

Segundo análisis:

Para evaluar en cuál de, los tres diferentes métodos de aglutinación se podía confiar más, se agruparon (Cuadro 3) y compararon los resultados obtenidos de las aglutinaciones en placa con sangre completa (SaC) suelo en placa (SuP) y suero en tubo (SuT). Estos resultados coincidieron en 11,301 exámenes de muestras (Combinaciones I, II y X) o sea un total de 98.7% y difirieron (II a IX) en 153 muestras (1.3%). Amerita hacer notar que en todas las pruebas de estas 153 muestras, los resultados de 2 métodos de aglutinación fueron iguales entre sí y distintos al tercero, lo que permitió totalizar cuántas veces uno de los métodos fue diferente a los otros dos. La comparación del total de discrepancias de cada método, reflejó cuál fue el más exacto.

En 21 casos (IV, V y VIII) los resultados de las reacciones fueron iguales en las aglutinaciones SaC y SuT y diferentes a la SuP. En otras 20 reacciones (III y IX) las agluti-

naciones SuT tuvieron resultados distintos a las SaC y SuP, las que a su vez fueron iguales entre sí.

Todos esos resultados indican que el número de discrepancias encontradas en las pruebas SuT, 20; SuP, 21, fueron escasas y similares, por lo que no es necesario discutirlos.

En 112 de los casos (VI y VII) los resultados de las reacciones de las aglutinaciones SuP y SuT fueron iguales entre sí, pero diferentes a SaC. Ese número tan alto de discrepancias sí amerita discusión.

En la combinación VII se ve que 58 muestras dudosas en la prueba SaC, dieron reacciones negativas con la SuT y SuP. Estas 58 reacciones dudosas se pueden considerar como falsas pues se efectuaron al aire libre o en casetas y el polvo, coágulos de sangre, filamentos de fibrina, etc., dificultaron su interpretación. Para evitar estas interpretaciones falsas es necesario realizar una segunda prueba de las aves cuyas muestras den reacciones dudosas, por lo cual estas discrepancias no se tomaron muy en cuenta. Para probarlo, a 25 pollas de las 58 que dieron reacciones de aglutinación dudosas en la aglutinación SaC, en la granja; se les practicó una segunda reac-

ción, inmediatamente después que los resultados de las pruebas SuP y SuT del laboratorio, fueron conocidos como negativos y se encontró que esas segundas reacciones, fueron también negativas.

Con las 54 discrepancias de la combinación VI (Cuadro 3) la situación fue distinta. Cuando se repitieron las reacciones 3 semanas después, 30 aves resultaron negativas y 24 positivas, a los 3 métodos de aglutinación. Las 30 aves que resultaron negativas se sometieron a dos pruebas más, con intervalo de 3 semanas entre cada prueba. Los resultados fueron también negativos en ambas pruebas por lo que se consideró que las pruebas primeras de SuT y SuP fueron de carácter no específico con una intensidad difícil de detectar en la prueba SaC.

El hecho de que 24 aves resultaran positivas, en la repetición de las pruebas de las 54 negativas en SaC y dudosas en SuT y SuP, puede explicarse si se considera que estas aves estaban en la granja donde existía un brote de pulorosis y por eso, es muy probable que su título de anticuerpos fue muy bajo, debido a lo reciente de la infección. En el lapso de tiempo a la siguiente prueba, aumentaron los anticuerpos y por esta razón las aves reaccionaron en forma positiva a todos los métodos.

Conclusiones

Tomando en cuenta que la prueba de aglutinación en placa con sangre completa es más práctica y económica que las otras dos aglutinaciones de suero en tubo y suero en placa y no obstante que los resultados obtenidos indican que la prueba de aglutinación en placa con-sangre completa es solamente un poco menos exacta que las otras dos, se puede aconsejar el uso del método de aglutinación en placa con sangre completa para pruebas rutinarias en las condiciones de México, pero sin olvidar tomar las medidas adecuadas para prevenir errores; la repetición inmediata de las pruebas dudosas y la necesidad de una segunda prueba, en un lapso de 3 a 4 semanas, en aquellas aves de reciente infección.

Resumen

En tres granjas de aves reproductoras, con un total de 2,800 animales, se realizó un ex-

perimento piloto tendiente a erradicar la pulorosis. Este experimento comprendió también la comparación de tres diferentes técnicas de aglutinación; sangre completa en placa, suero en placa y suero en tubo.

Después de cuatro series consecutivas de pruebas en las aves de dos granjas, donde clínicamente no existía pulorosis, se logró la erradicación de la enfermedad. Los reactores positivos fueron 4.4% y 3.0%. En la otra granja, donde se había presentado un brote de pulorosis, fueron necesarias 5 pruebas, una más que en las dos primeras granjas para erradicar la *S. pullorum*, encontrándose un 15.3% de reactores.

La comparación de los tres métodos de aglutinación, reveló pocas discrepancias en las reacciones con suero en placa y suero en tubo, siendo mayores en las reacciones de sangre completa en placa. Sin embargo, por ser más práctico y económico el método de aglutinación con sangre completa en placa, se puede recomendar para usos rutinarios, para empezar un plan de erradicación en México.

Literatura citada

- GORDON, R. F., 1953, Preparation of *S. pullorum* antigen, *Houghton Poultry Res. Sta. Houghton, Huntingdon, Inglaterra*, Mimeo.
- GORDÓN, R. F., 1942, The practical application of the rapid whole blood agglutination test for pullorum disease, *Vet. Rec.*, 54 (48) : 495-497.
- GORDÓN, R. F., 1963, Preparation of *S. pullorum* antigen. Comunicación personal.
- HAGAN, W. A. and D. W. BRUNER, 1951, The infectious Diseases of Domestic Animals, *Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, U.S.A.*, 2th ed., p. 208.
- ROEPKE, W. J., 1961, Der Geflügelgesundheitsdienst in den Niederlanden, *Archiv für Geflügelkunde*, 25:219.
- SMITS, W. H., 1954, Poultry course for foreign veterinarians, *Gezondheidsdienst voor Pluimvee, Soesterberg Netherland*, Mimeo.
- The National Poultry and Turkey Improvement Plans, 1961, *Animal Husbandry Res. División, Agriculture Research Service, Washington, D. C., U.S.A.* Publ. 379. p. 7, 30 y 31.

**COMPARACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE
AGLUTINACIÓN CON SANGRE
COMPLETA EN PLACA, SUERO EN TUBO
Y PLACA Y SU USO PARA LA
ERRADICACIÓN DE LA PULOROSIS EN 3
GRANJAS REPRODUCTORAS**

A 2,800 aves reproductoras de 3 granjas se les efectuaron aglutinaciones de sangre completa en placa, suero en tubo y placa con antígeno polivalente contra **Salmonella pullorum**. Se logró la erradicación de la enfermedad en dos granjas después de 4 series consecutivas de pruebas y en la 3a. granja fue necesaria una serie más; en esta granja se había presentado un brote de pulorosis. Los reactores positivos fueron 4.4% y 3.0% en las dos primeras granjas y 15% en la tercera. Al comparar los 3 métodos de aglutinación se encontraron pocas discrepancias con las reacciones de sangre completa en placa, pero se concluye que este último método es más práctico y económico y puede recomendarse para usos rutinarios en un plan de erradicación de la enfermedad en México.

HANS DIKKEN, Experto Asociado de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación adscrito al Departamento de Patología Animal del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. P.

Téc. Pec. en México, 8:19-23 (1966)

**COMPARAISON ENTRE LES PREUVES
D'AGGLUTINATION, AVEC SANG ENTIER EN
PLAQUES, SERUM EN TUBE ET PLAQUE ET
SON UTILISATION POUR L'ELIMINATION
DE LA PULOROSIS DANS 3 ELEVAGES DE
REPRODUCTION**

Dans 3 élevages on inocula à 2.800 volailles reproductrices des agglutinations de sang entier en plaque, sérum en tube et plaque, avec des antigènes polyvalents contre la **Salmonella pullorum**. On obtint l'élimination de la maladie dans 2 élevages après 4 séries consécutives d'épreuves, et dans le 3ème élevage il fut nécessaire d'appliquer une série supplémentaire; dans cet élevage il s'était présenté une épidémie de pulorosis. Les réactions positives furent 4.4% et 3.0% dans les 2 premiers élevages et 15% dans le troisième. A comparer les 3 méthodes d'agglutination on rencontra peu de différences avec les réactions de sang entier en plaque, mais la conclusion fut que cette dernière méthode se révèle plus pratique et économique et qu'elle peut être recommandée comme d'un usage courant dans l'élimination de la maladie à México.

HANS DIKKEN, Experto Asociado de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación adscrito al Departamento de Patología Animal del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

Téc. Pec. en México, 8:19-23 (1966)

**COMPARISON BETWEEN SERUM TUBE
TEST AND WHOLE BLOOD AND SERUM
PLATE TEST AND THEIR USE FOR
THE ERRADICATION OF PULLOROSIS IN
3 POULTRY BREEDING FARMS**

Agglutination tests were carried out on 2,800 birds from 3 breeding stock farms. The tests consisted of serum tube tests and whole blood and serum plate tests with a polivalent antigen against **Salmonella pullorum**. Erradication was possible in 2 farms after a series of 4 consecutive tests and in the 3rd farm, one more test was needed. The latter farm had had an outbreak of pullorosis. The positive reactors were 4.4% and 3.0% in the first two farms and 15% in the third. Few discrepancies were found when comparing the 3 agglutination methods. The conclusion arrived at is that the whole blood plate test can be recommended for routine use in the erradication of pullorosis in México because it is more practical and more economic to use.

HANS DIKKEN, Experto Asociado de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación adscrito al Departamento de Patología Animal del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

Téc. Pec. en México, 8:19-23 (1966)

**VERGLEICH ZWISCHEN
AGGLUTINATIONSPROBEN MIT
TOTALBLUT AUF DER PLATTE, SERUM IM
ROEHRCHEN UND SERUM AUF DER
PLATTE, UND IHRE VERWENDUNG BEI DER
PULLOROSEBE-KAEMPfung IN DREI DER
REPRODUKTION GEWIDMETEN
HUEHNERFARMEN**

Bei Verwendung von polyvalentem **Salmonella pullorum** Antigen wurden durch Agglutinationsproben, mit Totalblut auf der Platte und Serum im Roehrchen und auf der Platte 2.800 Reproduktionshennen drei verschiedener Farmen untersucht. Nach vier aufeinanderfolgenden Agglutinationen konnte die Infektion in zwei Farmen getilgt werden; in der dritten Farm, in der sich ein Pulloro-seausbruch praesentiert hatte, war eine zusaetzliche Serie notwendig. In den ersten beiden Farmen gab es 4.4% und 3.0% positive Reagenten, waehrend es in der dritten Farm 15% waren. Bei dem Vergleich der drei Methoden ergaben sich wenige Unterschiede, und abschliessend kann gesagt werden, dass die Totalblutmethode auf der Platte die praktischste und wirtschaftlichste ist und deshalb fuer Routinegebrauch bei der Tilgung der Krankheit in Mexiko Verwendung finden koennte.

HANS DIKKEN, Experto Asociado de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación adscrito al Departamento de Patología Animal del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

Téc. Pec. en México, 8:19-23 (1966)